

Փիզիկա

УДК 573.3:547.963.3

Е. Б. ДАЛЯН, И. В. ВАРДАНЯН

ВЛИЯНИЕ pH НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ CuТОЕРуР4 С ДНК

Методами спектрофотометрии и кругового дихроизма исследовано взаимодействие с ДНК Cu(II)-мезо-тетра(4N-гидроксиэтилпиридил)порфирина (CuТОЕРуР4) при различных pH. Получено, что независимо от pH эти металлопорфирины предпочитают взаимодействовать с ДНК методом интеркаляции. Расчеты показывают, что константа связывания CuТОЕРуР4 с ДНК сильно зависит от pH среды.

Введение. Интерес к исследованию молекулярных механизмов взаимодействия металлопорфиринов (в том числе и Cu-содержащих) с ДНК вызван высокой биологической активностью этих соединений, возможностью их использования в качестве противоопухолевых, противогрибковых, противовирусных и антибактериальных лекарственных средств [1–5]. В работе [5] было показано, что Cu(II)-мезо-тетра(4N-гидроксиэтилпиридил)порфирины (CuТОЕРуР4) в зависимости от их концентрации могут связываться с ДНК как посредством интеркаляции, так и по периферии макромолекулы. Однако можно предположить, что на механизм их связывания весьма существенно должны влиять условия среды, в частности pH. Известно, что изменение pH может приводить к существенному изменению конформации двойной спирали ДНК и даже к ее полной денатурации при экстремально кислых или щелочных pH (кислотная и щелочная денатурации) [6]. Естественно, что изменение конформации двуспиральной ДНК должно влиять на механизм взаимодействия порфиринов с ней. В данной работе методами UV/Vis-спектрофотометрии и кругового дихроизма (КД) исследовано взаимодействие с ДНК CuТОЕРуР4 в условиях различных pH среды.

Материалы и методы. В работе был использован сверхчистый препарат высокомолекулярной ДНК тимуса телят, выделенный в лаборатории профессора Д.Ю. Ландо в ИБОХ АН Республики Беларусь. Металлопорфирин CuТОЕРуР4, в котором боковым заместителем является гидроксипиридил-группа ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), был синтезирован на кафедре фармакологической химии Ереванского государственного медицинского университета. Область исследованных концентраций металлопорфирина в расчете на пару нуклеотидов ДНК $0,001 < r < 0,5$, где $r = C_{\text{порф}}/C_{\text{ДНК}}$. Исследования проводились

для трех значений pH: 5,02; 6,57 и 8,5. В качестве буфера был взят 0,1BPSE (1 BPSE=6 мМ Na₂HPO₄+2 мМ NaH₂PO₄+185 мМ NaCl+1 мМ EDTA), ионная сила [Na⁺]=0,02 М.

Спектры титрования снимались на спектрофотометре Lambda 800 UV-VIS, а спектры КД – на дихрографе Roussel Jouan-П.

Результаты и обсуждение.

Кривые плавления. На рис. 1 приведены кривые плавления комплексов ДНК с порфирином при различных значениях pH.

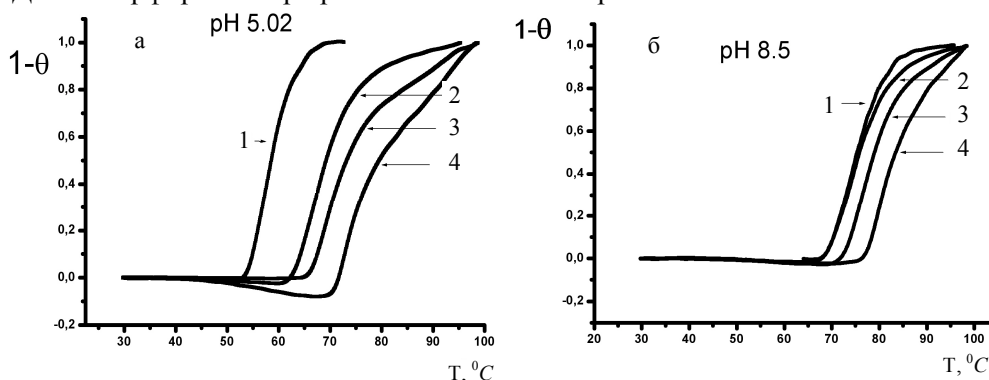


Рис. 1. Кривые плавления ДНК в присутствии CuTOEPyP4 в кислой (а) и щелочной (б) средах при различных относительных концентрациях порфирина: $r=0$ (1); 0,01 (2); 0,05 (3); 0,1 (4).

Из рис. 1 видно, что добавление металлопорфирина приводит к существенной стабилизации структуры ДНК. Как было показано нами в работе [5], при нормальных pH температура плавления ДНК в присутствии CuTOEPyP4 ($r=0,1$) увеличивается приблизительно на 5°C . Сдвиг pH в щелочную и, особенно, в кислую области приводит к еще более существенным изменениям кривых плавления. При тех же относительных концентрациях CuTOEPyP4 увеличение температуры плавления в щелочной среде порядка 10°C , а в кислой среде – 30°C . Сравнивая поведение кривых плавления ДНК без порфирина в кислой и щелочной средах (рис. 1) с результатами, полученными нами ранее в работе [5] для нейтральных pH, можно заметить, что в кислой среде как температура, так и интервал плавления ДНК существенно меньше, чем в нейтральной и щелочной. Это обусловлено тем, что при этих значениях pH в кислой среде протонируется N3-цитозина в расплавленном состоянии [6], что заметно ослабляет двойную спираль ДНК (гипохромный эффект – 29%). Добавление небольших количеств ($r=0,01$) металлопорфирина увеличивает термостабильность ДНК. При более высоких концентрациях металлопорфирина наблюдается также изменение формы кривой плавления ДНК, обусловленное избирательной стабилизацией ГЦ-богатых участков, что указывает на то, что порфирины предпочитают связываться с ГЦ-парами ДНК. А это, в свою очередь, указывает на интеркаляционный механизм связывания этих металлопорфиринов с ДНК [4].

Спектры КД. Известно, что хорошим тестом для установления типа связывания порфиринов с ДНК является анализ спектров КД (особенно индуцированной порфиринами полосы КД в видимой области света (ИКД)). Установлено, что отрицательное значение ИКД есть признак интеркаляционного, а положительное – внешнего упорядоченного связывания [3–5].

На рис. 2 приведены спектры КД комплексов ДНК с CuТОЕРуР4 при различных рН среды.

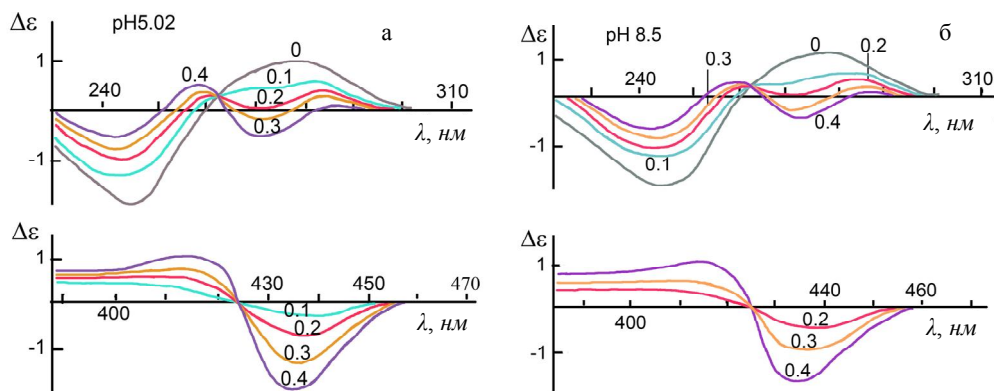


Рис.2. Спектры КД комплексов ДНК с CuТОЕРуР4 в кислой (а) и щелочной (б) средах при различных относительных концентрациях порфирина: $r=0,1; 0,2; 0,3; 0,4$.

Как видно из рис. 2, на спектрах КД как в кислой, так и в щелочной среде наблюдается четкая изобестическая точка. Кроме того, спектры ИКД в видимой области имеют либо отрицательное значение (при малых относительных концентрациях металлопорфирина), либо консервативны (при более высоких концентрациях). Все это подтверждает наш вывод о преимущественно интеркаляционном механизме связывания CuТОЕРуР4 с ДНК независимо от рН среды.

Параметры связывания. Для расчета параметров связывания CuТОЕРуР4 с ДНК в условиях различных рН снимались спектры поглощения металлопорфирина при добавлении ДНК различных концентраций. Увеличение концентрации ДНК приводит к уменьшению интенсивности полосы Sore с батохромным сдвигом. Кроме того, на спектрах титрования наблюдается изобестическая точка. Это также указывает на один (интеркаляционный) механизм связывания.

Данные, полученные по титрованию CuТОЕРуР4 раствором ДНК, были использованы для расчета параметров связывания: константы связывания K_b и числа мест посадки n (n – число пар оснований ДНК, которые становятся недоступными при связывании одной молекулы металлопорфирина). Для этого используется формула, предложенная Корреа с соавторами [7]:

$$C_f = -\frac{r}{K_b} \left[\frac{nr-1}{nr-r-1} \right]^{-n} (nr-r-1),$$

где C_f – концентрация свободных лигандов в растворе, которая определяется, как $C_f = C_0 - C_b$, $C_b = C_{\text{порф}}$ – концентрация связанного лиганда.

Результаты расчетов приведены в таблице.

рН	K_b	n
5,02	$9,54 \cdot 10^8$	2,24
6,57	$2,32 \cdot 10^6$	1,37
8,5	$1,24 \cdot 10^7$	1,07

Как видно из таблицы, константа связывания CuTOEPyP4 с ДНК сильно зависит от pH среды. Если в щелочной среде она увеличивается примерно в 5 раз, то в кислой среде – в 400 раз. По-видимому, ослабленная под действием кислых pH двойная спираль ДНК легче поддается конформационным перестройкам, необходимым для интеркаляции CuTOEPyP4 в структуру ДНК.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта FP6-037212.

Кафедра молекулярной физики

Поступила 28.03.2008

ЛИТЕРАТУРА

1. Aasanka M., Kurimura T., Toya H., Ogaki K., Kato Y. – AIDS, 1990, № 3, p. 403–404.
2. Dixon D.W., Marzilli L.G., Schinazi R.F. – Ann. NY Acad. Sci., 1990, № 616, p. 511–519.
3. Carvlin M.J., Datta-Gupta N., Fiel R.J. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, № 108, p. 66–73.
4. Pasrernak R.F., Gibbs E.J. – Metal Ions in Biological Systems, 1996, № 33, p. 367–397.
5. Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Ananyan G.V., Vardanyan V.I., Lando D.Y., Madakyan V.N., Kazaryan R.K., Messory L., Orioli P. and Benight A.S. – J. Biomol. Struct. & Dyn., 2001, v. 18, № 5, p. 677–687.
6. Lando D.Yu., Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Kul'ba A.M., Orioli P., Mangani R., Akhrem A.A. – J. Biomol. Struct. & Dyn., 1994, v. 12, № 2, p. 355–363.
7. Correia J.J., Chaires J.B. – Methods in Enzymology, 1994, v. 240, p. 593–614.

Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ, Ի. Վ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ

рН-ի ԱՉԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ CuTOEPyP4-Ի
ՓՈԽԱՉԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո մ

Լուսասպեկտրաչափական և շրջանային դիֆրոիզմի մեթոդներով ուսումնասիրվել է Cu(II)-մեզո-տետրա-(4N-հիդրօքսիէթիլպիրիդիլ)պորֆիրինի (CuTOEPyP4) փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ միջավայրի տարբեր pH-ների դեպքում: Յույց է տրված, որ անկախ pH-ից այս պորֆիրինների համար նախընտրելի է փոխազդեցության ինտերկալյացիոն ձևը: Հաշվարկները ցույց են տալիս, որ ԴՆԹ-ի հետ CuTOEPyP4-ի կապման հաստատունը խիստ կախված է միջավայրի pH-ից:

Ye. B. DALYAN, I. V. VARDANYAN

THE INFLUENCE OF pH ON INTERACTION OF CuTOEPyP4 WITH DNA

Summary

The interaction of Cu(II)-meso-tetra-(4N-hydroxyethylpyridyl)porphyrin (CuTOEPyP4) with DNA at different pH was studied by methods of spectrophotometry and circular dichroism. It was shown that these porphyrins bind to DNA preferably via intercalation. The calculations show that the constant of binding of CuTOEPyP4 with DNA strongly depend upon the pH.